



Gebrauchsanweisung

BITTE SORGFÄLTIG LESEN

SemenLeu

(Spermien Leukozyten Test)



Nur für den professionellen Gebrauch

Anwendung

Die Leukozytenzahl-Bestimmung in Samenflüssigkeit dient als Marker für die Funktion der akzessorischen Sexualdrüsen. Leukozyten, vor allem polymorph kernige Leukozyten (PML), sind in den meisten humanen Ejakulaten vorhanden. Diese können beim normalen Mikroskopieren morphologisch leicht mit multinukleären Spermatischen verwechselt werden. Bekannt ist, dass Peroxidaseenzymen histochemisch ausschließlich charakteristisch für die PM-Granulozyten sind.


Prinzip der Methode

Durch den Einsatz von Wasserstoffperoxid, lassen sich Peroxidase-positive Leukozyten (neutrophilen polymorphe Granulozyten) gelb bis braun färben. Andere Zellen (Spermien, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und multinukleäre Spermatischen) bleiben ungefärbt (Peroxidase-negative).

In diesem Test wird die Samenflüssigkeit mit den Reagenzien 1 und 2 behandelt, wobei sich lediglich Peroxidase-positive Zellen braun färben. Diese werden anschließend unter einem Phasenkontrastmikroskop identifiziert.

Lagerung und Haltbarkeit

 2-8°C

 24 Monate ab Herstellungsdatum. Die angesetzte AB-Lösung ist im Kühlschrank bis zum nächsten Tag verwendbar.

Inhalt (Lieferumfang)

- Reagenz 1 20 ml
- Reagenz 2 1 ml

Benötigte Utensilien (nicht im Lieferumfang enthalten)

- Deckgläser (18 x 18 mm)

- Feuchtkammer
- Handschuhe
- Mikroskop mit Phasenkontrast
- Nativejakulat oder gewaschene Spermien (100 µl)
- Objektträger
- Papiertücher
- Pipetten und Spitzen (10-100 und 100-1000 µl)
- Reagenzgefäß (2 ml)
- Reagenzgefäßständer
- Zählkammer

Vorbereitung der Arbeitslösung (AB):

Mischen Sie 1 ml von Reagenz 1 mit 20 µl von Reagenz 2. Sollten Sie bei der Untersuchung mehrere Proben aufarbeiten, müssen Sie die entsprechende Menge an AB ausrechnen.

Durchführung

1. 100 µl Ejakulat in ein Reagenzgefäß pipettieren
2. Zugabe von 900 µl AB-Lösung
3. Gut mischen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren (Schaumbildung vermeiden)
4. Inkubieren der Probe bei Raumtemperatur für 20-30 min
5. Schritt 3 wiederholen
6. Pipettieren Sie das Gemisch in eine Zählkammer. Stellen Sie die Zählkammer für vier Minuten in eine Feuchtkammer, um alle großen Zellen absinken zu lassen.

Auswertungsziel: Leukozytenzahl in Ejakulat

Leukozyten sind unter dem Mikroskop sind gelb bis braun gefärbt durch das Peroxidaseenzymen. Die Gesamtzahl Peroxidase-positiver Zellen pro Ejakulat lässt sich auf eine der folgenden Möglichkeiten berechnen:

Bekannte Konzentration an Spermatozoen:

Zählen Sie die Peroxidase-positiven Zellen und die Spermatozoen in mindestens 20 Blickfeldern bei 400x Vergrößerung aus. Die Konzentration der weißen Blutzellen wird anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{(Anzahl weißer Blutzellen / Anzahl Spermatozoen)}}{\text{x Spermienkonzentration (Mio./ml)}}$$

Diese Methode ist nur für Proben geeignet, die mehr als 10 Mio Spermien/ml enthalten.

Unbekannte Konzentration an Spermatozoen:

In diesem Fall wird die Konzentration der weißen Blutzellen durch Multiplikation mit einem Faktor ermittelt, der sich aus der Größe eines Blickfeldes und der Höhe des Abstands zwischen der Zählkammer und dem Deckglas (bzw. der Tiefe der Samenprobe) ergibt.

Der Durchmesser eines Blickfeldes kann mit einem Mikrometer gemessen werden. Der Flächeninhalt (s) entspricht dem Quadrat des Radius (r) multipliziert mit Pi ($s = \pi r^2$).

Bsp.: Blickfelddurchmesser = 250 μm , Radius = 125 μm → Flächeninhalt (s) = 49086 μm^2

Die Höhe zwischen dem Objektträger und dem Deckglas kann mit folgender Formel berechnet werden: Höhe [μm] = Volumen [μl] / (Länge [mm] x Breite des Deckglases [mm])

Bsp.: Volumen der Probe = 20 μl . Deckglas = 24 x 40 mm →

Höhe = $20 / (24 \times 40) = 0,0208 \text{ mm} = 20,8 \mu\text{m}$

Der Faktor, mit dem die Konzentration der weißen Blutzellen multipliziert werden muss, errechnet sich aus diesen Größen wie folgt: Faktor = $1.000.000 \mu\text{m}^3$ (Flächeninhalt x Höhe)

Bsp.: Faktor = $1\ 000\ 000 \mu\text{m}^3 / (49086 \mu\text{m}^2 \times 20,8 \mu\text{m}) = 0,98$

Wenn beispielsweise in einem Blickfeld 5 weiße Blutzellen gezählt werden, ergibt sich mit diesem Faktor eine Konzentration von 4,9 Millionen weißer Blutzellen pro ml Ejakulat.

Der Wert Peroxidase-positiver Leukozyten bei fertilen Männern liegt zwischen $0,5 \times 10^6$ und 10^6 bei einer Gesamtleukozytenzahl (Peroxidase-positiv und Peroxidase-negativ Zellen) zwischen 10^6 und 2×10^6 pro ml Ejakulat (WHO 2010).

Exzessives Vorkommen dieser Zellen (Leukozytospermie) kann eine Samenleiterinfektion anzeigen. Die Leukozytospermie kann auch mit einer Störung des Samenprofils einschließlich der Verminderung des Spermavolumens, der Spermienkonzentration und der Spermienbeweglichkeit einhergehen und einen Verlust der Spermienfunktion als Folge von oxidativem Stress (Aitken *et al.*, 1989; Aitken und West, 1990) oder der Sekretion zytotoxischer

Zytokine anzeigen. Es ist daher schwierig, einen exakten Grenzwert der Leukozytenkonzentration anzugeben, ab dem die Fruchtbarkeit gestört ist. Der Einfluss dieser Zellen hängt von der Stelle im Reproduktionskanal ab, an der die Leukozyten in das Sperma gelangen, vom Typ der Leukozyten und deren Aktivierungsgrad.

Wenn die Samenflüssigkeit mehr als 1×10^6 weiße Blutkörperchen pro ml enthält, soll die Probe mikrobiologisch auf eine Drüseninfektion untersucht werden.

Hinweis: Das Fehlen von Leukozyten schließt die Möglichkeit einer Drüseninfektion nicht aus.

Sicherheitshinweise/Vorsichtsmaßnahmen

(Bitte lesen sie auch die Sicherheitsdatenblätter)

- Alle Samenproben sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Behandeln Sie alle Proben so, als ob sie HIV oder Hepatitis übertragen könnten.
- Tragen Sie immer Sicherheitskleidung, wenn Sie mit Proben und Reagenzien arbeiten (Handschuhe, Kittel, Augen-/Gesichtsschutz).
- Das Reagenz 1 enthält Ortho Toluidin, das als krebserregend eingestuft wird. Hautkontakt oder Verschlucken sind zu vermeiden.
- Das Reagenz 2 enthält Wasserstoffperoxid (H_2O_2) das korrosiv wirkt und giftig beim Einatmen ist. Hautkontakt oder Verschlucken sind zu vermeiden.
- Kontaminierte Kleidung ist im Falle eines Unfalls mit den Reagenzien 1 und 2 sofort auszuziehen und einen Arzt aufzusuchen.

Referenzen

1. **Aitken RJ, West KM (1990)** Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13:433-451
2. **Aitken RJ et al. (1989)** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41:183-187
3. **Barratt CLR et al. (1990)** Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, 5:639-644
4. **Hill JA et al. (1987)** Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*, 47:460-465
5. **Politch JA et al (1993)** Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 60: 372-375
6. **WHO Press (2010)** laboratory manual for the examination and processing of human semen
7. **Wolff, H, Anderson, DJ (1988)** Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 53:528-536

Producer:

ANTIGENES
Medizinische Labordiagnostika Soukou
Hustadtring 151
44801 Bochum
Germany
Tel.: +49 234-91795580
Fax: +49 234-91795581
Email: info@antigenes.de
Homepage: www.antigenes.de

Distribution:

Gynemed GmbH & Co. KG
Lübecker Str. 9
23738 Lensahn
Germany
Tel.: +49 4363-903290
Fax: +49 4363-9032919
E-Mail: info@gynemed.de
Homepage: www.gynemed.de